

В.А. Кашпур, О.В. Хорунжа, Д.О. Песіна

Інститут радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова НАН України

12, вул. Акад. Проскури, м. Харків, 61085, Україна

E-mail: olgaxorun@gmail.com

Діелектрометрія гідратації флавінмононуклеотиду і ДНК

Предмет і мета роботи. З'ясування молекулярних механізмів дії біомолекул необхідне для розробки сучасних засобів діагностики захворювань та їх лікування. Для виявлення характеру взаємодії біомолекул з навколишнім водним розчинником ефективними є діелектричні дослідження в області міліметрових хвиль. Флавінмононуклеотид (ФМН), за допомогою якого можливе знищення мікроорганізмів і руйнування ракових клітин, викликає особливий інтерес. Мета роботи полягає у виявленні в розчинах ФМН гідратаційних ефектів (зміни стану молекул води).

Методи і методологія роботи. У діапазоні НВЧ виміряно комплексну діелектричну проникність (КДП). Зі знайденої різниці між КДП розчину ФМН і КДП води розраховано величину $\Delta\epsilon_s$, яка є різницею ефективних діелектричних проникностей ϵ_s в теорії Дебая полярних рідин. Оскільки час релаксації диполів зв'язаної води на один-два порядки більше, ніж цей час для вільної води, то значення $\Delta\epsilon_s$ характеризує гідратацію біомолекул; при малих концентраціях ця різниця пропорційна кількості зв'язаних молекул води.

Результати роботи. Показано, що з молекулою ФМН зв'язано близько 18 молекул води. Вказані групи атомів, які є найбільш ймовірними гідратними центрами (перш за все, завдяки водневим зв'язкам). При зниженні рН число молекул води, зв'язаних з ФМН, збільшується до 21. Дослідження розчину ФМН–ДНК показало, що сумарно на один нуклеотид припадає 25–26 зв'язаних молекул води, тоді як при складанні гідратаційних чисел компонентів було б менше 20. Припушено, що перевищення обумовлено кооперативним характером гідратації, який призводить до того, що частина тих молекул розчинника, які не контактують безпосередньо з гідратними центрами, також опиняються під впливом біомолекул.

Висновок. Надвисокочастотна діелектрометрія є ефективним методом вивчення взаємодії біомолекул з водно-йонним розчинником. Запропоновано модель гідратації ФМН, в якій вказані ймовірні центри гідратації і ступінь їх впливу на розчинник. Виявлено, що при взаємодії ФМН з ДНК відбувається збільшення кількості молекул зв'язаної води, які припадають на один нуклеотид ДНК. Отриманий результат зіставлено з існуючими моделями взаємодії ДНК з ФМН. Іл. 3. Табл. 3. Бібліогр.: 24 назв.

Ключові слова: діелектрометрія, флавінмононуклеотид, ДНК, гідратація.

Діелектричні вимірювання широко застосовуються для вивчення властивостей біологічних об'єктів. Зокрема, дослідження в області міліметрових хвиль або надзвичайно високих частот (НВЧ) ефективні для аналізу взаємодії біомолекул з навколишнім водним розчинником [1]. Відомо, що ця взаємодія (гідратація) великою мірою визначає багато властивостей біомолекул: структуру, стабільність, динаміку. З'ясовано, що на поверхні біомолекул утворюється шар видозміненої (так званої зв'язаної,

або гідратної) води, що грає ключову роль у багатьох біопроцесах.

Вивчення гідратації діелектричним методом засновано на тому факті, що рухливість молекул зв'язаної води значно менша за рухливість молекул вільної води: в першому випадку час релаксації диполів води τ становить $10^{-9} \dots 10^{-10}$ с [2], а в другому – близько 10^{-11} с [3]. Тому комплексна діелектрична проникність (КДП) біомолекул і зв'язаної води в діапазоні НВЧ обумовлена лише малими величинами атомної та

електронної поляризації. У КДП вільної води додатковий і набагато вагоміший — внесок дає компонент, обумовлений орієнтацією диполів води у НВЧ-полі. Визначаючи зв'язану воду як таку, в якій частоти дипольної релаксації набагато менші за аналогічні частоти вільної води, ми можемо за допомогою вимірювань у мм-діапазоні різниці між КДП розчинника і розчину біомолекул $\Delta\epsilon^*$ охарактеризувати взаємодію біомолекул з розчинником, а при використанні деяких модельних уявлень — дати кількісну оцінку ефектів гідратації.

Об'єктом цього дослідження є важлива біоактивна сполука — флавінмононуклеотид (ФМН), структурну формулу якого наведено на рис. 1. У складі молекули ФМН можна виділити три частини: ізоалоксазин, який складається з трьох ароматичних кілець, центральний фрагмент — залишок п'ятиатомного спирту рибіту і залишок фосфорної кислоти.

Попередником ФМН є рибофлавін (вітамін В₂), з якого ФМН утворюється в результаті приєднання фосфорної кислоти. Флавінмононуклеотид — основна форма рибофлавіну, який міститься в клітинах людини і тварин. Завдяки здатності брати участь у реакціях електронного переносу ФМН є каталізатором багатьох біохімічних процесів.

Флавінмононуклеотид є фотосенсибілізатором, тобто речовиною, молекули якої після поглинання світла переходять у збуджений стан, що дозволяє їм викликати фотохімічні або фотофізичні перетворення в іншій частині молекули. Після активації ультрафіолетом у молекулі ФМН утворюються синглетні форми кисню, а також супероксидний аніонний радикал, які можуть реагувати з ДНК, що призводить до її деградації. Використання цього ефекту дозволяє руйнувати нуклеїнові кислоти патогенних мікроорганізмів і в такий спосіб зменшувати їх здатність до розмноження та ініціювання інфекційних захворювань. Оброблення ФМН видимим світлодіодним світлом також здатне інактивувати патогенні мікроорганізми [4].

Оскільки транспорт ФМН у клітині регулюється білком-носієм, який інтенсивно виробляється раковими клітинами, то ФМН можна використовувати для націлювання на них. Синтез наночастинок, покритих ФМН (наприклад, наночастинок Fe₃O₄), і орієнтація таких

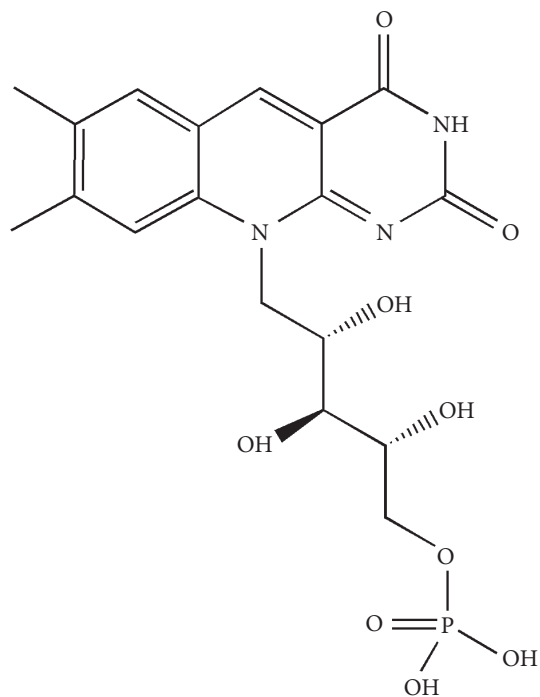


Рис. 1. Структурна формула флавінмононуклеотиду (рибофлавін-5'-фосфату)

частинок на рецептори білка-носія відкриває перспективи для розвитку методів селективного накопичення наноліків у пухлинах [5]. Таргетні властивості ФМН були продемонстровані для карциноми молочної залози, шийки матки, простати. Флавінмононуклеотид практично не токсичний [6].

Вважається, що ФМН є перспективним діагностичним і протипухлинним засобом, але подальше його застосування обмежується невизначеністю молекулярного механізму дії. Особливо нагальним є вивчення взаємодії ФМН з ДНК, первинну структуру якої наведено на рис. 2. Вирішальний вплив на структуру, динаміку та функції біомолекул чинить стан молекул води їх гідратної оболонки [7], тому для розуміння механізму взаємодії ФМН з ДНК необхідні також дослідження процесів гідратації. Однак на цей час відомості про характеристики взаємодії ФМН з нуклеїновими кислотами та з водним розчинником неповні і частково суперечливі.

Метою цієї роботи було отримання інформації про стан молекул розчинника навколо флавінмононуклеотиду і в системі ДНК—ФМН. Це дослідження є продовженням робіт, присвячених з'ясуванню властивостей водного розчин-

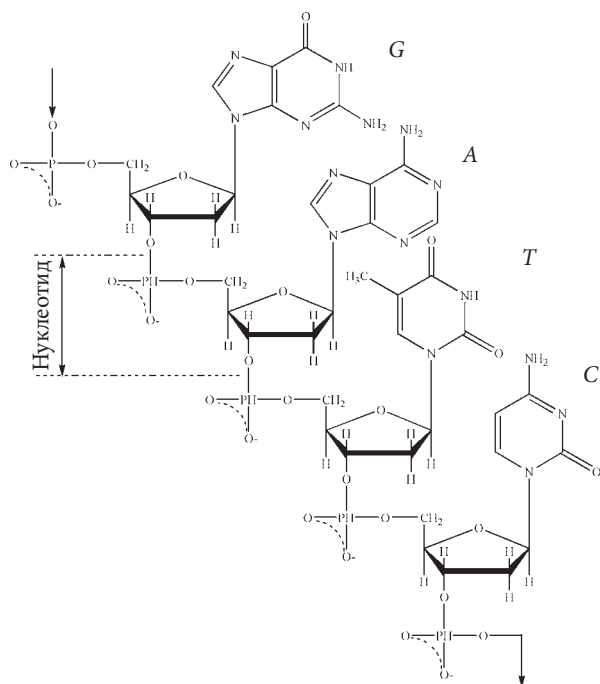


Рис. 2. Схема первинної структури ДНК [8], де G – гуанін, А – аденін, Т – тимін, С – цитозин

ника в комплексах «ДНК – біологічно активна речовина» [9].

1. Методи і результати дослідження. У роботі використовували натрієву сіль ДНК з тимуса теляти (з молекулярною масою M понад 10^7 Да) виробництва фірми *Sigma* і натрієву сіль флавін-мононуклеотиду ($M = 456$) виробництва фірми *Fluka*. Відмінність натрієвої солі ФМН від ФМН полягає в тому, що в групі атомів P–OH водень заміщений іоном натрію: P–ONa⁺. Кислі розчини ФМН отримували за допомогою 10%-го розчину HCl. Для точного визначення концентрації досліджуваних розчинів знаходили вміст вологи у вихідних препаратах. Концентрація С розчину ФМН становила 2 %.

Кількість іонів визначали шляхом вимірювань електропровідності на частоті 10 кГц за допомогою моста змінного струму Р568 у комірці з платиновими електродами (похибка 1 %). Зіставляючи отримані значення з величинами виміряної нами електропровідності калібрувальних розчинів NaCl (в межах концентрацій 0,01...0,1 М) і використовуючи довідкові дані стосовно електролітичної рухливості йонів ($\lambda_{\text{Na}^+}^0 = 50,1 \cdot 10^{-4}$ См·м²·моль⁻¹ і $\lambda_{\text{Cl}^-}^0 = 76,3 \cdot 10^{-4}$ См·м²·моль⁻¹ при 25 °С) [10], ми знайшли, що 2%-ний розчин ФМН містив

0,08 М Na⁺. Таким чином, у досліджуваному зразку по відношенню до сухої ваги ФМН було 9 % іонів Na⁺, тобто концентрація ФМН без іонів становила 1,82 %.

Досліджуючи взаємодію ДНК з ФМН, до водного розчину нуклеїнової кислоти багаторазово додавали невеликі обсяги (краплі) концентрованого водного розчину ФМН. Гомогенність всіх зразків забезпечувалася ретельним розмішуванням. Розчини були стабільними, осадження не спостерігалось. Іонна сила становила 0,08 М NaCl у всіх вимірюваннях.

Робочі концентрації ДНК і ФМН малі, тому в роботі використовувався розроблений нами диференційний метод [9], який дозволяє у НВЧ-діапазоні визначати невеликі відмінності між КДП двох рідин. Безпосередньо вимірювали різницю $\Delta\alpha$ між коефіцієнтами поглинання еталонної рідини (наприклад, розчинника) і досліджуваного розчину, а також різницю $\Delta\beta$ між фазовими коефіцієнтами еталона і розчину. З $\Delta\alpha$ і $\Delta\beta$, використовуючи відомі електродинамічні співвідношення $\epsilon' = \left(\frac{\lambda}{\lambda_{cr}}\right)^2 + \left(\frac{\lambda}{2\pi}\right)^2 (\beta^2 - \alpha^2)$ і $\epsilon'' = 2\left(\frac{\lambda}{2\pi}\right)^2 \alpha \cdot \beta$, обчислювали значення дійсної ϵ' та уявної ϵ'' частин КДП досліджуваного зразка. Робоча довжина хвилі λ становить 7,6 мм (частота 39,5 ГГц), а критична довжина хвилі хвилеводу $\lambda_{cr} = 20,3$ мм.

Необхідні для визначення КДП речовин, що вивчалися, значення ϵ' і ϵ'' води обчислювали за допомогою експериментальних даних та інтерполяційної схеми, що наведені в [11]. Ця схема враховує основні опубліковані результати і дозволяє знаходити діелектричні характеристики води в діапазонах частот 0...100 ГГц та температур 0...60 °С. Діелектричні параметри води наведені в табл. 1.

Внесок компонента $\delta\epsilon''$ в $\Delta\epsilon''$, обумовлений електропровідністю розчинів σ , визначали за формулою $\delta\epsilon'' = \frac{\sigma\lambda}{c}$, де c – швидкість світла [12]. При визначенні $\delta\epsilon''$ використовували також еталонні розчини NaCl, для яких величини $\delta\epsilon''$ відомі.

Вимірювання проводили багаторазово, отримані дані усереднювали. Похибки вимірювань $\Delta\alpha$ і $\Delta\beta$ становлять відповідно $\pm 0,0006$ Нп/мм

і $\pm 0,0004$ рад/мм, що відповідає значенням похибок $\pm 0,005$ для $\Delta \epsilon''$ і $\pm 0,01$ для $\Delta \epsilon''$. При використуваних концентраціях розчинів такі величини відповідають відносним похибкам $\Delta \epsilon'$ і $\Delta \epsilon''$ в 2...3 %.

Експериментальні результати та розраховані параметри для розчинів ФМН при нейтральному і кислотному рН наведено в табл. 2. Знайдені величини $\Delta \alpha$, $\Delta \beta$ є різницями відповідних діелектричних параметрів розчинника і розчинів ФМН. Параметр $\Delta \epsilon''_{cor}$ характеризує зменшення діелектричних втрат розчину ФМН, обумовлене тільки зміною величини дипольної поляризації води (тобто враховується зростання ϵ'' розчину за рахунок іонної провідності): $\Delta \epsilon''_{cor} = \Delta \epsilon'' + \delta \epsilon''$.

У табл. 2 наведено також експериментальні результати і розраховані параметри для розчинів ДНК і ДНК–ФМН для нейтрального рН. Для розчинів ДНК–ФМН величини $\Delta \alpha$ і $\Delta \beta$ є різницями відповідних параметрів розчинів ДНК–ФМН і ДНК. Аналогічні величини для розчинів ДНК є різницями параметрів розчинів ДНК і води. На одну молекулу ФМН припадають 8,5 нуклеотиду ДНК. Концентрація С ДНК дорівнює 0,58 %, ФМН – 0,104 %, Na^+ – 0,09 %.

2. Аналіз результатів досліджень. Діелектричні властивості води і водних розчинів, з високою точністю описуються теорією, розробленою Дебаєм для полярних рідин. З використанням цієї теорії були визначені параметри ϵ_s (ефективна проникність, що є низькочастотною межею величини ϵ' в області дипольної дисперсії) і λ_s (довжина хвилі, відповідна центральній частоті цієї дисперсії) для води (див. табл. 1) та розчинів ФМН, ДНК і ДНК–ФМН (див. табл. 3). Ці два параметри визначаються з співвідношень $\epsilon_s = \epsilon' + \frac{\epsilon''^2}{(\epsilon' - \epsilon_\infty)}$ і $\lambda_s = \frac{\lambda \epsilon''}{(\epsilon' - \epsilon_\infty)}$, що є оберненими для рівнянь Дебая, де ϵ_∞ – високочастотна границя ϵ' в області дебаєвської дисперсії.

Наявність у ФМН іонів Na^+ призводить також до зниження ϵ_s зразків на величину $\delta \epsilon_s$. Для визначення внесків саме біомолекул $\Delta \epsilon_s^*$ у виміряні $\Delta \epsilon_s$ ($\Delta \epsilon_s^* = \Delta \epsilon_s - \delta \epsilon_s$) ми використовували знайдені кількості йонів і відоме значення діелектричного декременту Na^+ . Величи-

на $\delta \epsilon_s$ для одного моля Na^+ дорівнює 8 [13], а при 0,8 М (що відповідає вищевказаним 0,18 % Na^+ в розчині) – 0,64.

Оскільки міліметровий діапазон не є областю дисперсії і поглинання ДНК та нуклеотидів [14], то зменшення діелектричної проник-

Таблиця 1. Діелектричні параметри води, $\lambda = 7,6$ мм

Параметр	Значення		
T, °C	18	19	27
α	2,70	2,71	2,77
β	4,83	4,89	5,37
ϵ'	16,2	16,7	21,3
ϵ''	26,1	26,5	29,8
ϵ_s	81,2	80,8	78,1
λ_s , мм	18,90	18,34	14,44
ϵ_∞	5,74	5,73	5,66

Таблиця 2. Діелектричні параметри розчинів ФМН, ДНК і ДНК–ФМН

Параметр	Розчин			
	ФМН	ФМН	ДНК	ДНК–ФМН
pH	6,5	5,1	6,5	6,5
T, °C	19	27	18	18
$\Delta \alpha$	0,057	0,0625	0,0108	0,0084
$\Delta \beta$	0,069	0,081	0,0074	0,0092
α	2,65	2,71	2,69	2,68
β	4,82	5,29	4,82	4,81
ϵ'	16,34	20,77	16,18	16,14
ϵ''	25,58	28,68	25,92	25,79
$\delta \epsilon''$	0,151	0,196	0,076	0,008
$\Delta \epsilon''_{cor}$	25,43	28,48	25,84	25,70

Таблиця 3. Параметри гідратації ФМН і ДНК–ФМН

Параметри	ФМН	ФМН	ДНК	ДНК–ФМН
pH	6,5	5,1	6,5	6,5
T, °C	19	27	18	18
ϵ_s	77,40	74,46	80,15	79,68
$\Delta \epsilon_s$	3,42	3,60	1,02	1,484
$\delta \epsilon_s$ (Na^+)	0,636	0,636	–	0,033
$\Delta \epsilon_s^*$ (без Na^+)	2,78	2,97	1,02	1,45
λ_s , мм	18,20	14,29	18,76	18,74
ν , см ³ /г	0,574	0,574	0,581	0,580
ω , г води / г речовини	0,70	0,84	0,88	1,21
n, молекул води	17,8	21,3	16	25

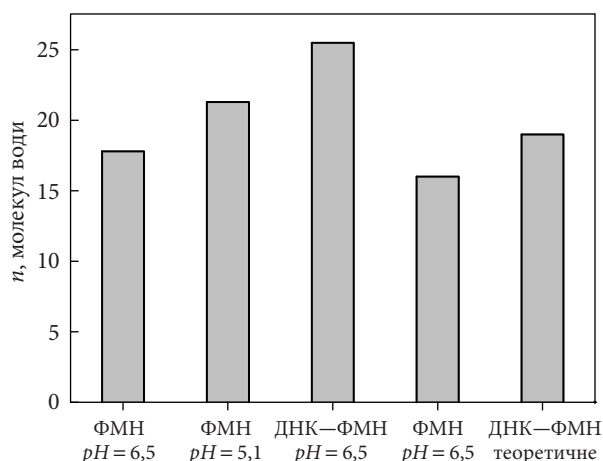


Рис. 3. Параметри гідратації ФМН і ДНК-ФМН

ності свідчить про те, що частина молекул води під впливом біомолекул перейшла у зв'язаний стан з різко зниженою рухливістю. Міліметровий діапазон є областю дисперсії дипольної поляризації води, тому ϵ' і ϵ'' зразків залежать від двох параметрів — величини і часу релаксації поляризації. Для вивчення гідратації, пов'язаної зі зміною характеру поляризації молекул води, доцільно описувати діелектричні властивості зразків за допомогою параметрів ϵ_s (залежить тільки від ступеня поляризації) і часу дипольної релаксації τ або ефективної довжини хвилі $\lambda_s \left(\tau = \frac{\lambda_s}{2\pi \cdot c} \right)$.

Для кількісного визначення ступеня гідратації нами використаний той факт, що в роботі досліджуються тільки малі концентрації C біомолекул. Тому різниця $\Delta\epsilon_s$ між ϵ_s розчину і води (за будь-якої залежності КДП суміші від КДП компонентів [15, 16]) є лінійною функцією об'ємів біомолекул і зв'язаної води, які замінили частину об'єму розчинника:

$$\Delta\epsilon_s = pC \left[(\epsilon_s - \epsilon_\infty^b) \nu + (\epsilon_s - \epsilon_\infty^w) \omega \right], \quad (1)$$

де p — коефіцієнт, що залежить від форми біомолекули; ν і ω — питомі уявні об'єми біомолекул (ДНК [17] і ФМН [18]) та зв'язаної води (у $\text{см}^3/\text{г}$), відповідно. Значення ϵ_∞^b біомолекул і ϵ_∞^w зв'язаної води у НВЧ-діапазоні обумовлені лише малими величинами атомної та електронної поляризацій [12]: $\epsilon_\infty^b = 4$ [2, 14]. Значення ϵ_∞^w води обчислено за допомогою співвідношень Дебая і використання розрахованих нами значень діелектричної проникності (табл. 1).

Воно збігається з вказаним у [11] значенням $\epsilon_\infty^w = 5,7$ при вимірюваннях КДП води у діапазоні 30...100 ГГц. Оскільки об'єм і маса води чисельно збігаються, то ω позначає також число грамів води, зв'язаної з грамом розчиненої речовини.

Точне значення p для молекул складної форми невідоме, тому в роботі використовується значення $p = 1,58$ — воно відповідає гідратації ДНК, що дорівнює 16 молекулам води в розрахунку на один нуклеотид. Число 16 є середнім для гідратаційних чисел ДНК, визначених різними методами (рентгеноструктурний аналіз, інфрачервона спектроскопія, калориметрія): $11 \leq n \leq 20$ [8, 19, 20]. З іншого боку, 1,58 є середнім між значеннями p , які обчислені Фріке для суміші діелектриків при розгляді двох граничних ідеалізованих випадків вкрапельень — у вигляді сфери ($p = 1,50$) і у вигляді циліндра ($p = 1,66$) [21]. З огляду на малу величину діапазону можливих p , ми використовували $p = 1,58$ також і для оцінки гідратації ФМН.

Величини λ_s розчинів незначно відрізняються від λ_s розчинника. Отже, в розчинах зміни в динамічних властивостях води відбуваються практично лише в тонкому приповерхневому шарі навколо біомолекул.

В останньому рядку табл. 3 гідратація подає на числом молекул зв'язаної води, що припадають на молекулу ФМН або на один нуклеотид n . Молекулярна маса нуклеотиду в середньому становить 327, а разом з ФМН — 380 (для використаної концентрації). Похибка величини n , розрахована з величин похибок $\Delta\alpha$ і $\Delta\beta$, становить одну молекулу води.

Зауважимо, що визначення гідратації на основі вимірювань на більш низьких радіочастотах (але не в діапазоні НВЧ) утруднено наявністю в цьому випадку областей дисперсії біомолекул.

Розрахунок за формулою (1) показує, що гідратація молекули ФМН становить близько 18 молекул води. З огляду на характер розподілу електронної щільності в атомах О, Н і N, ми припускаємо, що взаємодія ФМН з розчинником здійснюється, перш за все, завдяки водневим зв'язкам. У такому випадку найбільш імовірними місцями зв'язування води є дві групи С=О і одна Р=О, з кожною з яких можливо зв'язування двох молекул H_2O . Гідратноактивними є

також п'ять груп ОН (плюс група NH) і три атоми N. З кожним з цих центрів гідратації може бути зв'язана одна молекула H₂O. Таким чином, разом виходить 16 молекул зв'язаної води, що близько до експериментального значення.

З табл. 3 видно, що зі зниженням рН число молекул води, зв'язаних з молекулою ФМН, зростає до 21. Можливо, цей ефект пояснюється тим що, за умови рН = 3...5 ФМН переходить у відновлену форму ФМН·Н₂. При цьому до нього приєднуються два електрони, а до двох атомів азоту — два атоми водню, які здатні утворювати водневі зв'язки з водою.

Аналіз даних табл. 3 свідчить, що декремент діелектричної проникності $\Delta\epsilon$, для розчину, що містить і ДНК, і ФМН, не є адитивною сумою величин декрементів розчинів компонентів. З огляду на вищесказане про частотні властивості дисперсії ДНК і води, можна вважати, що спостережуване зростання $\Delta\epsilon$, за наявності обох біомолекул у розчині вказує на додаткову гідратацію біомолекул.

Порівняння параметрів гідратації для ФМН і ДНК—ФМН наведено на рис. 3.

Розрахунок за формулою (1) показує, що в середньому при перерахунку на нуклеотид у ДНК (яка в розчині з ФМН) припадає 25—26 молекул H₂O. При складанні чисел гідратації компонентів було б менше 20 (одна молекула ФМН на 8,5 нуклеотиду). Більш того, слід зауважити, що при утворенні міцного комплексу ДНК—ФМН гідратаційні сайти компонентів взаємодіяли б між собою, що призвело б до дегідратації. У розчинах комплексів ДНК з кофеїном і хлорофіліном такий ефект спостерігався [1].

Отриманий результат узгоджується з висновком, зробленим у роботі [22], що константа зв'язування ФМН з ДНК, розрахована з спектроскопічних даних, на кілька порядків менша за звичайні константи зв'язування біоактивних лігандів з ДНК.

У нашому випадку зростання кількості зв'язаних молекул води може бути обумовлене кооперативним характером гідратації — частина молекул розчинника, які не контактують безпосередньо з гідратно-активними центрами компонентів, опиняються під впливом біомолекул. Такі молекули води мають знижену рухливість і змінені термодинамічні властивості [23]. Їх число зростає, можливо, навіть у випадку, коли ФМН не утворює міцного зв'язку з ДНК, а лише дифундує по ізоенергетичних сайтах ДНК (як це має місце в комплексі ДНК—спермін) [24].

Висновки. Надвисокочастотна діелектрометрія є ефективним методом вивчення взаємодії біомолекул з водно-йонним розчинником. Оцінка ступеня гідратації показала, що з однією молекулою ФМН зв'язано 18 молекул води за умови рН = 6,5 і 21 молекула води — при рН = 5,1. Запропоновано модель гідратації ФМН, в якій вказані ймовірні центри гідратації і ступінь їх впливу на розчинник. Виявлено, що в результаті взаємодії ФМН з ДНК при нейтральному рН відбувається збільшення кількості молекул зв'язаної води, які припадають на один нуклеотид ДНК (від 16 до 25), що перевищує суму чисел гідратації вільних компонентів. Отриманий результат зіставлено з існуючими моделями взаємодії ДНК з ФМН.

БІБЛІОГРАФІЧНИЙ СПИСОК

1. Кашпур В.А., Хорунжая О.В., Песина Д.А., Шестопалова А.В., Малеев В.Я. Гидратационные эффекты при образовании комплексов ДНК с некоторыми лигандами. *Биофизика*. 2017. Т. 62, вып. 1. С. 39—46.
2. Mashimo S., Kuwabara S., Yagihara S., Higasi K. Dielectric relaxation time and structure of bound water in biological materials *J. Phys. Chem.* 1987. Vol. 91, Iss. 25. P. 6337—6338. DOI: <https://doi.org/10.1021/j100309a005>.
3. Kaatze U., Uhlendorf V. The Dielectric Properties of Water at Microwave Frequencies. *Z. Phys. Chem.* 1981. Vol. 126. P. 151—165. DOI: <https://doi.org/10.1524/zpch.1981.126.2.151>.
4. Wong T.W., Cheng Ch.W., Hsieh Z.J. Effects of blue or violet light on the inactivation of *Staphylococcus aureus* by riboflavin-5'-phosphate photolysis. *J. Photochem. Photobiol. B*. 2017. Vol. 173. P. 672—680. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphoto-biol.2017.07.009>.
5. Jayapaul J., Arns S., Bunker M., Weiler M., Rutherford S., Comba P., Kiessling F. In vivo evaluation of riboflavin receptor targeted fluorescent USPIO in mice with prostate cancer xenografts. *Nano Res.* 2016. Vol. 9, Iss. 5. P. 1319—1333. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12274-016-1028-7>.
6. Akasov R.A., Sholina N.V., Khochenkov D.A., Alova A.V., Gorelkin P.V., Erofeev A.S., Generalova A.N., Khaydukov E.V. Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of flavin mononucleotide. *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. Article number: 9679. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46115-w>.

7. Fogarty A.C., Duboué-Dijon E., Sterpone F., Hynes J.T., Laage D. Biomolecular hydration dynamics: a jump model perspective. *Chem. Soc. Rev.* 2013. Vol. 42, Iss. 13. P. 5672–5683. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3CS60091B>.
8. Зенгер В. *Принципы структурной организации нуклеиновых кислот*. Пер. с англ. Москва: Мир, 1987. 584 с.
9. Кашпур В.А., Малеев В.Я., Хорунжа О.В. Применение метода дифференциальной КВЧ диэлектromетрии в молекулярной биофизике. *Радиофизика и электрон.*: сб. науч. тр. Ин-т радиофизики и электрон. НАН Украины. Харьков, 2008. Т. 13, спец. вып. С. 446–454.
10. Антропов Л.И. *Теоретическая электрохимия*. 4-е изд., перераб. и доп. Москва: Высшая школа, 1984. 519 с.
11. Ellison W.J., Lamkaouchi K., Moreau J.-M. Water: A dielectric reference. *J. Mol. Liq.* 1996. Vol. 68, Iss. 2–3. P. 171–279. DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-7322\(96\)00926-9](https://doi.org/10.1016/0167-7322(96)00926-9).
12. Хиппель А.Р. *Диэлектрики и волны*. Пер. с англ. под ред. Н.Г. Дроздова. Москва: Изд-во иностранной литературы, 1960. 439 с.
13. Craig D.Q.M. *Dielectric analysis of pharmaceutical systems*. London, Bristol: Taylor & Francis, 1995. 246 p.
14. Globus T.R., Woolard D.L., Khromova T., Crowe T.W., Bykhovskaia M., Gelmont B.L., Hesler J., Samuels A.C. THz-spectroscopy of biological molecules. *J. Biol. Phys.* 2003. Vol. 29, Iss. 2–3. P. 89–100. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1024420104400>.
15. Grant E.H. The Dielectric Method of Estimating Protein Hydration. *Phys. Med. Biol.* 1957. Vol. 2, Iss. 1. P. 17–28. DOI: <https://doi.org/10.1088/0031-9155/2/1/303>.
16. Ray S. and Behari J. Microwave absorption in lossy liquids. *Phys. Med. Biol.* 1986. Vol. 31, Iss. 9. P. 1031–/0031-9155/31/9/008.
17. Бреслер С.Е. *Введение в молекулярную биологию*. Москва: Наука, 1966. 524 с.
18. Durchschlag H., Zipper P. Calculation of the partial volume of organic compounds and polymers. Lechner M.D. (eds). *Ultracentrifugation. Progress in Colloid and Polymer Science*. Vol. 94. Steinkopff Publ., 1994. DOI: <https://doi.org/10.1007/BFb0115599>.
19. Привалов П.Л. Вода и ее роль в биологических системах. *Биофизика*. 1968. Т. 13, вып. 1. С. 163–177.
20. Harmouchi M., Albiser G., Premilat S. Changes of hydration during conformational transitions of DNA. *Eur. Biophys. J.* 1990. Vol. 19, Iss. 2. P. 87–92. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00185091>.
21. Buchanan T.J., Haggis G.H., Hasted J.B. The dielectric estimation of protein hydration *Proc. Roy. Soc. Ser. A. Math. Phys. Sci.* 1952. Vol. 213, Iss. 1114. P. 379–391. DOI: <https://www.jstor.org/stable/99075>.
22. Березняк Е.Г., Гладковская Н.А., Духопельников Е.В., Хребтова А.С., Зинченко А.В. Спектроскопическое и калориметрическое исследование системы флавин-моноклеотид — ДНК. *Біофізичний вісник*. 2010. Т. 24, вип. 1. С. 14–19. DOI: <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/article/view/3865/3432>.
23. Schneider B., Ginell S.L., Berman H.M. Low temperature structures of dCpG-proflavine. Conformational and hydration effects. *Biophys. J.* 1992. Vol. 63, Iss. 6. 1572–1578. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81755-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81755-1).
24. Korolev N., Lyubartsev A.P., Laaksonen A., Nordenskiöld L. On the competition between water, sodium ions, and spermine in binding to DNA: a molecular dynamics computer simulation study. *Biophys. J.* 2002. Vol. 82, Iss. 6. P. 2860–2875. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75628-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75628-2).

Стаття надійшла 16.06.2021

REFERENCES

1. Kashpur, V.A., Khorunzhaya, O.V., Pesina, D.A., Shestopalova, A.V., Maleev, V.Ya., 2017. Hydration effects accompanying the formation of DNA complexes with some ligands. *Biophysics*, **62**(1), pp. 31–37. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0006350917010092>.
2. Mashimo, S., Kuwabara, S., Yagihara, S., Higasi, K., 1987. Dielectric relaxation time and structure of bound water in biological materials. *J. Phys. Chem.*, **91**(25), pp. 6337–6338. DOI: <https://doi.org/10.1021/j100309a005>.
3. Kaatz, U., Uhlendorf, V., 1981. The Dielectric Properties of Water at Microwave Frequencies. *Z. Phys. Chem.*, **126**, pp. 151–165. DOI: <https://doi.org/10.1524/zpch.1981.126.2.151>.
4. Wong, T.W., Cheng, Ch.W., Hsieh, Z.J., 2017. Effects of blue or violet light on the inactivation of *Staphylococcus aureus* by riboflavin-5'-phosphate photolysis. *J. Photochem. Photobiol. B*, **173**, pp. 672–680. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.07.009>.
5. Jayapaul, J., Arns, S., Bunker, M., Weiler, M., Rutherford, S., Comba, P., Kiessling, F., 2016. In vivo evaluation of riboflavin receptor targeted fluorescent USPIO in mice with prostate cancer xenografts. *Nano Res.*, **9**(5), pp. 1319–1333. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12274-016-1028-7>.
6. Akasov, R.A., Sholina, N.V., Khochenkov, D.A., Alova, A.V., Gorelkin, P.V., Erofeev, A.S., Generalova, A.N., Khaydukov, E.V., 2019. Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of Flavin mononucleotide. *Sci. Rep.*, **9**. Article number: 9679. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46115-w>.
7. Fogarty, A.C., Duboué-Dijon, E., Sterpone, F., Hynes, J.T., Laage, D., 2013. Biomolecular hydration dynamics: a jump model perspective. *Chem. Soc. Rev.*, **42**(13), pp. 5672–5683. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3CS60091B>.
8. Saenger, W., 1984. *Principles of nucleic acid structure*. Springer-Verlag: New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo.
9. Kashpur, V.A., Maleev, V.Ya., Khorunzhaya, O.V., 2008. Application of differential method of EHF dielectrometry in molecular biophysics. In: V.M. Yakovenko, ed. 2008. *Radiofizika i elektronika*. Kharkov: IRE NAS of Ukraine Publ. 13(spec. iss.), pp. 446–454 (in Russian).
10. Антропов, Л.И., 1984. *Theoretical electrochemistry*. Moscow: High school Publ. (in Russian).
11. Ellison, W.J., Lamkaouchi, K., Moreau, J.-M., 1996. Water: A dielectric reference. *J. Mol. Liq.*, **68**(2–3), pp. 171–279. DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-7322\(96\)00926-9](https://doi.org/10.1016/0167-7322(96)00926-9).

12. Von Hippel, A.R., 1954. *Dielectrics and Waves*. New York, Wiley; London, Chapman & Hall.
13. Craig, D.Q.M., 1995. *Dielectric analysis of pharmaceutical systems*. London, Bristol: Taylor & Francis.
14. Globus, T.R., Woolard, D.L., Khromova, T., Crowe, T.W., Bykhovskaia, M., Gelmont, B.L., Hesler, J., Samuels, A.C., 2003. THz-spectroscopy of biological molecules. *J. Biol. Phys.*, **29**(2–3), pp. 89–100. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1024420104400>.
15. Grant, E.H., 1957. The Dielectric Method of Estimating Protein Hydration. *Phys. Med. Biol.*, **2**(1), pp. 17–28. DOI: <https://doi.org/10.1088/0031-9155/2/1/303>.
16. Ray, S., and Behari, J., 1986. Microwave absorption in lossy liquids. *Phys. Med. Biol.*, **31**(9), pp. 1031–1040. DOI: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-9155/31/9/008>.
17. Bresler, S.E., 1971. *Introduction to Molecular Biology*. Academic Press, New York and London.
18. Durchschlag, H., Zipper, P., 1994. Calculation of the partial volume of organic compounds and polymers. In: Lechner M.D. (eds). *Ultracentrifugation. Progress in Colloid and Polymer Science*. Vol. 94. Steinkopff Publ. DOI: <https://doi.org/10.1007/BFb0115599>.
19. Privalov, P.L., 1968. Water and its role in biological systems. *Biophysics*, **13**(1), pp. 163–177 (in Russian).
20. Harmouchi, M., Albiser, G., Premilat, S., 1990. Changes of hydration during conformational transitions of DNA *Eur. Biophys. J.*, **19**(2), pp. 87–92. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00185091>.
21. Buchanan, T.J., Haggis, G.H., Hasted, J.B., 1952. The dielectric estimation of protein hydration. *Proc. Roy. Soc. Ser. A. Math. Phys. Sci.*, **213**(1114), pp. 379–391. DOI: <https://www.jstor.org/stable/99075>.
22. Bereznyak, E.G., Gladkovskaya, N.A., Dukhopelnikov, E.V., Khrebtova, A.S., Zinchenko, A.V., 2010. Spectroscopic and calorimetric investigation of Flavin mononucleotide – DNA system. *Biophys. Bull.*, **24**(1), pp. 14–19 (in Russian). DOI: <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/article/view/3865/3432>.
23. Schneider, B., Ginell, S.L., Berman, H.M., 1992. Low temperature structures of dCpG-proflavine. Conformational and hydration effects. *Biophys. J.*, **63**(6), pp. 1572–1578. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81755-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81755-1).
24. Korolev, N., Lyubartsev, A.P., Laaksonen, A., Nordenskiöld, L., 2002. On the competition between water, sodium ions, and spermine in binding to DNA: a molecular dynamics computer simulation study. *Biophys. J.*, **82**(6), pp. 2860–2875. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75628-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75628-2).

Received 16.06.2021

V.A. Kashpur, O.V. Khorunzhaya, D.A. Pesina

O.Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of NAS of Ukraine
12, Acad. Proskury St., Kharkiv, 61085, Ukraine

DIELECTROMETRY OF HYDRATION OF FLAVIN MONONUCLEOTIDE AND DNA

Subject and Purpose. The elucidation of the molecular mechanisms of action of biomolecules is necessary for the development of state-of-the-art means of diagnosing and treatment. Dielectric studies in the millimeter wave range are effective for puzzling out the nature of the interaction of biomolecules with a surrounding aqueous solvent. Flavin mononucleotide (FMN), which can kill microorganisms and destroy cancer cells, is of particular interest. The aim of the work is to recognize hydration effects (changes in the state of water molecules) in FMN solutions.

Methods and Methodology. The complex dielectric permittivity (CDP) is measured in the EHF range. Knowing the difference between the CDP of FMN solution and the CDP of water we find the difference, $\Delta\epsilon_s$, between the effective dielectric permittivities in terms of the Debye theory of polar liquids. Since the relaxation time of dipoles of bound water is one or two orders of magnitude longer than that of free water, the amount of the difference $\Delta\epsilon_s$ characterizes the hydration of biomolecules. At low concentrations, this difference is proportional to the number of bound water molecules.

Results. It has been shown that approximately 18 water molecules are bound to the FMN molecule. Groups of atoms as the most probable hydration centers (primarily due to the hydrogen bonds) have been indicated. As the pH decreases, the number of water molecules bound to the Flavin mononucleotide increases to 21. The study of the FMN–DNA solution has shown that one nucleotide accounts for 25–26 bound water molecules in total. However, composing hydration numbers assumes a quantity of components less than 20. An assumption is made that the additional components are due to the cooperative nature of the hydration, leading to the fact that even if some solvent molecules do not come into a direct contact with hydration centers, they are under the influence of biomolecules all the same.

Conclusion. Extremely-high-frequency dielectrometry is an effective method of research into the interaction of biomolecules with a water-ionic solvent. A FMN hydration model has been proposed, which indicates probable hydration centers and tells a measure of their effect on the solvent. It has been found that the FMN with DNA interaction increases the number of bound water molecules per one nucleotide of the DNA. The obtained results have been compared to the existing models of the DNA with FMN interaction.

Key words: dielectrometry, Flavin mononucleotide, DNA, hydration.